

## EFEECTO DE LA INOCULACIÓN AL CULTIVO ANTECESOR SOBRE LA NODULACIÓN DE LA SOJA, EN SUELOS DE DESMONTE.

SOTELO, Cristina E.<sup>1</sup>, LCONTE, Maria C.<sup>2</sup>, IGLESIAS, Maria C.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Becaria Pregrado 2004–2005 Ciencia y Técnica. Cátedra de Microbiología Agrícola

<sup>2</sup> Cátedra de Microbiología Agrícola FCA –UNNE. Sargento Cabral 2131 CP. 3400. Corrientes

cristinasotelo4480@yahoo.com.ar

### RESUMEN

En los suelos de Chaco y Corrientes recién desmontados o bien en suelos de muchos años de agricultura sin cultivo de soja, la nodulación de esta leguminosa es deficiente. Por lo expuesto se necesitan buscar tecnologías económicamente rentables para el aumento de la infectividad de soja con *Bradyrhizobium japonicum* en estas situaciones problemáticas. El objetivo del presente trabajo fue determinar si la nodulación de plantas de soja es afectada por la inoculación del cultivo antecesor con *B. japonicum*. El ensayo se realizó en condiciones de invernadero, utilizando como sustrato el suelo de un lote recién desmontado ubicado en el Dorsal Agrícola Chaqueño. Se sembró maíz como antecesor. Los tratamientos fueron: 1– antecesor sin inocular– soja sin inocular; 2– antecesor sin inocular – soja inoculada; 3– antecesor inoculado– soja sin inocular; 4– antecesor inoculado – soja inoculada; 5– antecesor doble inoculación– soja sin inocular; 6– antecesor doble inoculación – soja inoculada. Luego de cincuenta días, las plantas de soja inoculadas en las que el cultivo antecesor no fue inoculado (tratamiento 2) presentaron los mayores valores de peso seco aéreo, mientras que las plantas de soja no inoculadas cuyo cultivo antecesor fue inoculado dos veces (tratamiento 5) presentaron los menores valores de peso seco aéreo y peso seco radicular. Los tratamientos inoculados en soja presentaron mayor infectividad, independientemente de la inoculación del cultivo anterior. Si bien son necesarios posteriores ensayos, en el presente trabajo la inoculación del cultivo antecesor no afectó las variables analizadas relacionadas con la nodulación de la soja.

**Palabras clave:** *Bradyrhizobium japonicum*– nodulación– especificidad– Chaco

### ABSTRACT

Nodulation of soybean crops grown on land which has not received this crop for many years or has recently been deforested is inadequate. It is necessary to develop profitable inoculation techniques in order to increase *Bradyrhizobium japonicum* infectivity on soybean crops. The aim of this paper is to determine whether nodulation of soybean is affected when the previous crop is inoculated with *B. japonicum* in one of the problematic cases. The trial was carried out in greenhouse environment, using soil from a recently cleared forest patch in the “Dorsal Agrícola Chaqueña” which had maize planted as predecessor crop.

The trials were:

- 1 predecessor without inoculation – soybean without inoculation;
- 2 predecessor without inoculation – soybean inoculated;
- 3 predecessor inoculated – soybean without inoculation;
- 4 predecessor inoculated – soybean inoculated;
- 5 predecessor with double inoculation – soybean without inoculation;
- 6 predecessor with double inoculation – soybean inoculated;

50 days later, inoculated soybean planted after predecessor without inoculation (trial 2) showed the highest aerial dry matter values, whereas soybean without inoculation planted after a predecessor with double inoculation (trial 5) showed the lowest aerial and root dry matter values. Inoculation treatments on soybean showed higher levels of infectivity, regardless of whether the predecessor crop was inoculated or not.

Provided that further research is needed, in this work predecessor crop inoculation did not affect the variables related to soybean nodulation.

**Key words:** *Bradyrhizobium japonicum* – nodulation – specificity – Chaco.

### INTRODUCCIÓN

El cultivo de soja (*Glycine max*) año a año incorpora nuevas tierras para ser sumada a la producción nacional. La necesidad de los productores agrícolas

de elevar al óptimo su producción y de mejorar la calidad de sus productos, incluyendo el elevado costo de fertilización, presenta a la inoculación como una herramienta útil que puede complementar al sistema

productivo. El cultivo de soja tiene la característica de generar nódulos en sus raíces como consecuencia de la asociación simbiótica con bacterias específicas como *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982), *Bradyrhizobium elkanii* (Kuykendall *et al.*, 1992), *B. liaoningense* (Xu *et al.*, 1995) y *Sinorhizobium fredii* (Chen *et al.*, 1988). Dicha característica le permite al cultivo abastecerse de nitrógeno proveniente del aire, cubriendo hasta un 70% las necesidades de ese nutriente (Weber, 1966). La fijación de nitrógeno solo ocurre en presencia de una o varias cepas efectivas de *Rhizobium* que pueden infectar la raíz y formar los nódulos (Caldwell, 1969). Las primeras sojas implantadas se inocularon con inoculantes importados con efectividad desconocida. Como consecuencia de ello, las grandes zonas sojeras de la Argentina contienen bacterias, que entran en simbiosis pobres con el cultivo de soja (Brutti *et al.*, 1998). La fijación de nitrógeno en las leguminosas, como la soja, tiene gran interés agronómico porque es un medio económico de mantener o aumentar el contenido de nitrógeno en el suelo, además de producir proteínas de calidad. Con la inoculación se obtuvieron incrementos tanto de materia seca como de granos en un 35% (Galal *et al.*, 2000). La supervivencia de la bacteria depende del nivel introducido y del nivel de población nativa: si esta es alta, el inóculo puede fallar debido a la mortandad natural y a la competencia con la población nativa por el alimento y espacio (Frioni, 1999). En la Argentina en condiciones de campo, una cepa del inoculante de soja requiere al menos tres campañas de cultivo antes de convertirse en la cepa dominante formadora de nódulos. Una vez establecidos en el suelo su capacidad de persistir es de 5 años, con capacidad de nodulación en ausencia de la planta huésped y por lo tanto, podría ser recomendada para su uso como un inoculante (Brutti *et al.*, 1998).

Los rizobios introducidos por inoculantes a menudo permanecen en el suelo después de la cosecha de los cultivos y, dentro de varios años, estas cepas pueden dar lugar a poblaciones naturalizadas, que por lo general tiene un bajo potencial de fijación de nitrógeno. La población de *Bradyrhizobium* que se recuperó de un suelo tenía un alto grado de diversidad genética, pero no hay desequilibrio de ligamiento, lo que sugiere la existencia de intercambio horizontal genético entre los miembros de la población (Bottomley *et al.* 1994). Un modelo reciente de la microevolución de las poblaciones de rizobios fue propuesto por Provorov y Vorobyov (2000), en el que los ciclos de infección de plantas y liberación de los nódulos senescentes podrían permitir a los genotipos modificados aumentar rápidamente su proporción en las poblaciones de bacterias locales. En este escenario, la inoculación en las semillas con las mismas cepas darían menos beneficios debido a la competencia

con la población naturalizada, que podría formar una proporción importante de los nódulos de las raíces (Sadowski y Graham, 1999). Por ejemplo, Werner (1992) informó que, en suelos templados, con una población de 104 a 105 rizobios  $g^{-1}$  de suelo reduce hasta 50%, la ocupación de nódulos por la cepa inoculada mientras que en los suelos tropicales, Thies *et al.* (1991) encontraron que una población de rizobios infecciosa de sólo 50  $g^{-1}$  de suelo fue suficiente para eliminar cualquier posible efecto del inoculante en el rendimiento de grano.

En un estudio realizado por Redolatti *et al.* (2004) se evaluó el efecto de inocular al verdeo de invierno (trigo) previo al cultivo de soja y compararlo con la inoculación tradicional del cultivo. Los resultados obtenidos muestran que la inoculación de la semilla de verdeo de invierno previo a la siembra de la semilla de soja inoculada, podría resultar una práctica efectiva en aquellas zonas que normalmente tienen problemas para lograr una eficiente nodulación.

En los suelos de Chaco y Corrientes recién desmontados o bien en suelos de muchos años de agricultura sin antecesor soja, la nodulación es deficiente. Por lo expuesto se necesitan buscar tecnologías económicamente rentables para el aumento de la infectividad de soja con *B. japonicum* en estas situaciones problemas. La hipótesis del trabajo es que la inoculación del cultivo antecesor, introduce o incrementa la población de *B. japonicum* en el suelo, y parte de esta población podría persistir hasta la implantación del cultivo de soja lo que afectaría positivamente la nodulación de la misma.

El objetivo del presente trabajo fue determinar si la nodulación de plantas de soja aumenta al inocular el cultivo antecesor con *B. japonicum*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó en invernáculo, se usaron macetas con capacidad de 5 l. El diseño fue en bloques completamente al azar, con 4 repeticiones, todos los tratamientos fueron inoculados con *B. japonicum*., en soporte líquido conteniendo  $1 \times 10^9$  UFC/ml. El suelo corresponde a un lote recién desmontado ubicado en el Dorsal Agrícola Chaqueño, donde no se cultivó soja previamente (Tabla 1).

El ensayo contó con dos ciclos el primero con maíz y el segundo con soja. En el primer ciclo se sembraron 5 semillas de maíz por maceta con un poder germinativo del 95%. Al momento de la siembra se inocularon las semillas con *B. japonicum*.

Los tratamientos fueron los siguientes: 1- antecesor sin inocular- soja sin inocular (ASI-SSI) 2- antecesor sin inocular - soja inoculada (ASI-SI) 3- antecesor inoculado- soja sin inocular (AI-SSI) 4- antecesor inoculado - soja inoculada (AI-SI) 5- antecesor doble inoculación- soja sin inocular (ADI-

**Tabla 1:** Análisis de suelo

pH	M.O. %	N %	P ppm	Ca meq/100 g	Mg meq/100 g	K meq/100 g
6,12	4,75	0,31	20,65	9,08	5,07	0,58

SSI) y 6– antecesor doble inoculación – soja inoculada (ADI–SI).

Para los tratamientos con doble inoculación las semillas se humedecieron con el inoculante, se las dejó orear, y se las volvió a inocular. Luego de sesenta días, se procedió a cosechar las plantas. Las macetas se mantuvieron en un período de reposo hasta la siguiente siembra (30 días) con la cobertura correspondiente.

Se realizó la siembra de soja inoculada en las macetas que anteriormente tuvieron maíz. Se sembraron 5 semillas para luego ralea a 3 plantas por maceta. Una vez terminada la experiencia (50 días) se procedió a extraer las plantas para realizar recuento de nódulos, peso seco y posición (raíz principal y raíces secundarias) de los mismos. También se determinó peso seco de las plantas (parte aérea y radical). Los resultados se analizaron mediante ANOVA, con el Modelo lineal– General AOV/AOCV y prueba de Tukey para comprobación de los promedios ( $p < 0,05$ ).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

A los cincuenta días de la siembra se observaron diferencias significativas en el peso seco aéreo y radical de las plantas de soja en los diferentes tratamientos ensayados. El tratamiento ASI–SI (tratamiento 2) presentó los mayores valores de peso seco aéreo, mientras que el tratamiento ADI–SSI (tratamiento 5) presentó los menores valores tanto de peso seco aéreo como radical (Fig. 1).

En la variable altura el tratamiento ASI–SI (2) presentó el mayor valor, si bien la diferencia con el resto

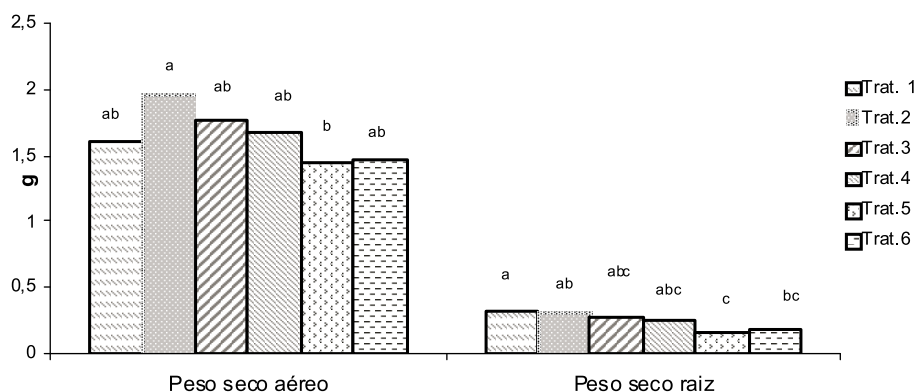
**Tabla 2:** Altura (cm) de la soja al concluir el ensayo. Ubicación de los nódulos en la estructura de la raíz y peso total de los nódulos.

Tratamientos	Altura de soja cm (50 días)	Nódulos en la raíz principal	Nódulos en las raíces secundarias	Peso seco de nódulos totales (g)
1 (ASI–SSI)	35,66 a*	6 a	9 a	0,34 a
2 (ASI–SI)	45,50 a	12 a	11 a	0,28 a
3 (AI–SSI)	42,66 a	8 a	9 a	0,26 a
4 (AI–SI)	40,60 a	10 a	10 a	0,26 a
5 (ADI–SSI)	38,20 a	7 a	7 a	0,17 a
6 (ADI–SI)	38,66 a	9 a	11 a	0,22 a

\* Letras distintas en una columna indican diferencias significativas (Tukey,  $p < 0,05$ )

de los tratamientos no fue estadísticamente significativa (Tabla 2).

Con respecto a la infectividad, se advirtió que el tratamiento ASI–SI (2) superó a los demás en el número de nódulos. Los tratamientos en los que se inoculó la soja son los que presentaron más alto grado de nodulación, ya sea en la raíz principal como en las secundarias independientemente de la inoculación del cultivo anterior (Tabla 2). Esto coincide con algunos autores que mencionan la importancia de algunas características de la cepa introducida para el éxito de la nodulación. Melchiorre *et al.*, 2011 menciona que el éxito en el proceso de nodulación después de la inoculación se determina por varios factores, tales como fertilidad del suelo y la competitividad de las cepas del inoculante, que tienen que ser capaces de sobrevivir y colonizar raíces de las plantas en un en-



**Figura 1:** Peso seco aéreo y de raíz (g) en los distintos tratamientos, al finalizar el ensayo. Las letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey,  $p < 0,05$ ).

torno con abundantes microorganismos nativos. Las cepas seleccionadas para su uso como inoculantes necesita poseer dos características importantes: deberían mostrar alta capacidad de fijación de nitrógeno (Howieson *et al.*, 2000, Rodríguez Blanco *et al.*, 2010) y también debe ser capaz de competir con rizobios nativos en los suelos (Martensson, 1989). Es importante comprender los mecanismos involucrados en la competitividad de las cepas indígenas de *Bradyrhizobium* en la soja, por que son críticas para aumentar la nodulación por las cepas seleccionadas (Bhagwat y Keister, 1992). Thies *et al.* (1991) informó que un aumento significativo en el rendimiento de la soja se observó sólo cuando por lo menos el 66% de los nódulos fueron formados por la cepa introducida por el inoculante.

El peso seco de los nódulos fue mayor en el tratamiento ASI-SSI, esto indica que había rizobios nativos que nodulan soja, pero no son tan efectivos, si se considera el peso seco aéreo y altura como indicador de efectividad. Si se observa los estudios realizados a nivel genético vemos que, si los rasgos de la competencia se intercambian entre un inoculante y los rizobios del suelo nativos, la población resultante será con alta competitividad y la nodulación tendrá baja eficiencia de fijación de nitrógeno y esto podría suceder en unos pocos ciclos de la introducción del inóculo. En este escenario, la inoculación de semillas con las mismas cepas o nuevas seleccionadas haría menos beneficios debido a la competencia con la población naturalizada, que podría acabar formando una proporción importante de los nódulos de las raíces (Sadowski y Graham, 1999). Por ejemplo, Werner (1992) informó que, en suelos templados, con una población de 104 a 105 rizobios g<sup>-1</sup> de suelo redujo la ocupación de nódulos por la cepa inoculada hasta 50%, mientras que en los suelos tropicales, Thies *et al.*, (1991) encontraron que una población de rizobios infecciosa sólo 50 g<sup>-1</sup> de suelo fue suficiente para eliminar cualquier posible efecto del inoculante en el rendimiento de grano.

En este ensayo no hubo beneficio con la inoculación al cultivo antecesor para aumentar la nodulación en soja. Esto se puede deber a que esta es la primera campaña que se sembraba soja y como lo observó Racca, 2003 el equilibrio de las poblaciones de *Rhizobium* pueden alterarse con adiciones sucesivas de otras cepa, pero la diferencia a favor de la cepa inoculante ocurre recién después del tercer ciclo de inoculación. Solo cepas muy competitivas pueden alterar el equilibrio; otras, hasta el quinto ciclo no lo hacen. Sin embargo la competencia que se establece entre cepas de *B. japonicum* naturalizadas en el suelo, y las que se introducen a través de la inoculación también es un factor muy importante a tener en cuenta en años posteriores. A partir de esto surgen dos puntos

clave; la necesidad de introducir cepas eficientes al suelo para mantener una alta producción de nitrógeno y el conocimiento de la población de *B. japonicum* naturalizadas y nativa, a fin de realizar nuevas re inoculaciones, en tiempo y forma adecuadas (Paytas, 2002).

## CONCLUSIONES

La inoculación del antecesor no presentó aumento en la nodulación de la soja, teniendo que proseguir la experiencia en varias campañas para asegurar esta respuesta.

## BIBLIOGRAFIA

- Bhagwat AA, Keister DL. 1992. Identification and cloning of *Bradyrhizobium japonicum* genes expressed strain selectively in soil and rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 58:1492–1495
- Bottomley, P.J., Cheng, H.-H., and Strain, S.R. 1994. Genetic structure and symbiotic characteristics of a *Bradyrhizobium* population recovered from a pasture soil. *Appl Environ Microbiol* 60: 1754–1761.
- Caldwell, B.E. 1969 Initial competition of root nodule bacteria on soybeans in a field environment. *Agron. J.*, 61:813–815.
- Chen WX, Yan GH, Li JL. 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol*;38:392–7.
- Frioni L. 1999. Procesos microbianos Tomo II. Editorial de la fundación Universidad Nacional de Río Cuarto (Cordoba). p 286.
- Galal, Y.G.M.; I.A. El-Ghandour; S.S Aly; S. Soliman; A. Gadalla. 2000. Non-isotopic method for the quantification of biological nitrogen fixation and wheat production under field conditions. *Biol Fertil Soil* 32:47–51.
- Howieson JG, Malden J, Yates RJ, O'Hara GW. 2000 Techniques for the selection and development of elite inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum* in southern Australia. *Symbiosis* 28:33–48
- Jordan DC. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen.nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int J Syst Bacteriol*;32:136–9.
- Kuykendall LD, Saxena B, Devine TE, Udell SE. 1992 Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *B. elkanii* sp. nov. *Can J Microbiol*;38:501–5.
- Lucrecia Brutti, Emilia Rivero, Juan Cancio Pacheco Basurco, Marisa NicolaÁs, Liliana Iriarte, Nora Abbiatid, Hans Ljunggren, Anna Martensson, 1998 Persistence of *Bradyrhizobium japonicum* in arable soils of Argentina *Applied Soil Ecology* Vol. 10. 87–94
- Martensson AM. 1989. Competitiveness of inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in

- red clover using repeated inoculation and increased inoculum levels. *Can J Microbiol* 36:136–139
- Melchiorre Mariana; De Luca Marcos J.; Gonzalez Anta Gustavo; Suarez Paola; Carlos Lopez; Lascano Ramiro y Racca Roberto W. 2011. Evaluation of bradyrhizobia strains isolated from field-grown soybean plants in Argentina as improved inoculants *Biol Fertil Soils* 47:81–89. DOI 10.1007/s00374-010-0503-7
- Paytas M.J, Iglesias María C. 2002 Comportamiento de cepas naturalizadas de *Rhizobium*–*Bradyrhizobium* en distintos suelos del Noreste de la provincia de Santa Fé en el cultivo de soja. Reunión de comunicaciones científicas y tecnológica UNNE sección Ciencias Agrarias. N° 41.
- Provorov, N.A., and Vorobyov, N.I. 2000. Population genetics of rhizobia: construction and analysis of an ‘infection and release’ model. *J Theor Biol* 205: 105–119.
- Racca, R 2003. Inoculación en soja: una herramienta fundamental para maximizar la productividad. Cuadernillo N° 78 *AgroMercado Soja*: 32–39 p. I.S.S.N. 1514–2213
- Redolatti M. Y Calviño, P.A. 2004. Inoculación del verdeo de invierno previo a la soja, en lotes sin *Rhizobium* específicos naturalizados. XIX Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo – Paraná. p 119.
- Rodriguez Blanco A, Sicardi M, Frioni L 2010. Competition for nodule occupancy between introduced and native strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Biol Fertil Soils* 46:419–425
- Sadowski, M.J., and Graham, P.H. 1999. Agricultural and environmental applications of nitrogen fixing organisms. In *Highlights of Nitrogen Fixation Research*. Martínez, E., and Hernández, G. (eds). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 219–223.
- Thies, J.E., Singleton, P.W., and Bohlool, B.B. 1991. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. *Appl Environ Microbiol* 57: 19–28.
- Weber C.R. 1966. Nodulation soybean isolines. *Agron. J.* 58:43–49.
- Werner, D. 1992. *Symbiosis of Plants and Microbes*. London: Chapman & Hall. © 2002 Blackwell Science Ltd, *Environmental Microbiology*, 4, 216–224 224 S. L. López–García et al.
- Xu LM, Ge C, Cui Z, Li J, Fan H. 1995 *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int J Syst Bacteriol*;45:706–11.